

**Fair skin agent which improves rough skin - contains e.g. whey fraction of milk containing e.g. insulin like growth factor**

**Patent Number : JP08133943**

*International patents classification : A61K-007/48 A61K-007/00 A61K-038/22 A61K-038/27*

**• Abstract :**

JP08133943 A Agent comprises whey fraction of colostrum of ruminants or whey fraction of milk derived from animals with single stomach which contains insulin like growth factor, transformation growth factor and fibroblast growth factor. Also claimed is the agent comprising cream fraction, film fraction of milk fat granule and butter milk fraction of ruminants or non-ruminants which contains fibroblast growth factor and heparin sulphate proteoglycan.

USE - The agent improves rough skin, and has anti-allergic activity.

In an example, human milk obtd. from a new-born baby (within 2 week old) was separated into cream and skim milk by centrifuging. Butter milk fraction was obtd. from cream, and casein was eliminated by adjusting pH at 4.6 or ethanol precipitation method. The fraction was desalted by ultrafiltration of fraction molecular wt. 3,000 or dialysis, and freeze-dried to give human butter milk derived FGF (HBM-FGF). On the other hand, CaCl<sub>2</sub> and ethanol were added to the skim milk, heated at 40 deg.C, and beta-lactoglobulin in the supernatant was immobilized using retinoic acid aminocerulefine resin (RA-cerulefine). RA-cerulefine non-absorbed substance was desalted and freeze-dried to give human skim milk derived growth factor (BCSM-GFs). The backs (5 mm<sup>2</sup>) of mice (4 days old and 16 week old) were applied with xylene to make rough skin, and 16 hrs. later, gaze soaked with beauty soln. (500 ml) contg. BCSM-GFs 1% was applied on the rough backs of the mice, and kept for 48 hrs. under the same conditions. As a control, the commercially available beauty soln. was applied. The skin condition of the sample improved, whereas that of the control did not improve. (Dwg.0/2)

**• Publication data :**

Patent Family : JP08133943 A 19960528 DW1996-31 A61K-007/48 4p \* AP: 1994JP-0293679 19941104  
Priority n° : 1994JP-0293679 19941104  
Covered countries : 1  
Publications count : 1

**• Patentee & Inventor(s) :**

Patent assignee : (KYOD ) KYODO NYUGYO KK

**• Accession codes :**

Accession N° : 1996-306444 [31]  
Sec. Acc. n° CPI : C1996-097562

**• Derwent codes :**

Manual code : CPI: B04-B04K B04-H06  
B14-G02A B14-N17C B14-R01 D08-B09A  
Derwent Classes : B04 D21

**• Update codes :**

Basic update code :1996-31

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

AN \*\*\*1996:494246\*\*\* CAPLUS  
 UN 125:123279  
 TI Cosmetic skin conditioners containing growth factors  
 IN Ooishi, Hifumi; Tani, Hisanori; Hatsutori, Takashi  
 PA Kyodo Milk Ind, Japan  
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 4 pp.  
 CODEN: JKXXAF  
 DT Patent  
 LA Japanese  
 IC ICM A61K007-48  
 ICS A61K007-00; A61K038-22; A61K038-27  
 CC 62-4 (Essential Oils and Cosmetics)  
 FAN.CNT 1

XP-002196945

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 08133943	A2	19960528	JP 1994-293679	19941104
AB	A skin prepn. contains (1) human as well as cow milk whey fractions containing insulin-like growth factor, plasma conversion factor, and fibroblast growth factor, or (2) cream fractions of milk containing fibroblast growth factor and heparan sulfate proteoglycan, and butter milk fractions.				
ST	cosmetic skin milk fraction growth factor				
IT	Milk				
	(cosmetic skin conditioners containing milk fractions with growth factors)				
IT	Cosmetics				
	(skin conditioners containing milk fractions with growth factors)				
IT	Proteoglycans, biological studies				
	RL: BUU (Biological use, unclassified); BIOL (Biological study); USES (Uses)				
	(heparitin sulfate-containing, cosmetic skin conditioners containing milk fractions with growth factors and)				
IT	9004-10-8, Insulin, biological studies				
	RL: BUU (Biological use, unclassified); BIOL (Biological study); USES (Uses)				
	(analogs; cosmetic skin conditioners containing milk fractions with growth factors and)				
IT	62031-54-3, Fibroblast growth factor				
	RL: BUU (Biological use, unclassified); BIOL (Biological study); USES (Uses)				
	(cosmetic skin conditioners containing milk fractions with growth factors)				

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-133943

(43) 公開日 平成8年(1996)5月28日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 7/48				
7/00	K			
38/22	ADA			
		A 6 1 K 37/ 24	ADA	
		37/ 36		
		審査請求 未請求 請求項の数 3	FD (全 4 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-293679

(22) 出願日 平成6年(1994)11月4日

(71) 出願人 000162412

協同乳業株式会社

東京都中央区日本橋小網町17番2号

(72) 発明者 大石 一二三

東京都立川市西砂町3-15-24

(72) 発明者 谷 久典

東京都福生市本町31-2-203

(72) 発明者 服部 隆史

東京都小平市上水本町5-1-19-205

(74) 代理人 弁理士 石山 博 (外1名)

(54) 【発明の名称】 美肌剤

(57) 【要約】

【目的】 ヒト及びウシなどの単胃及び反芻動物の乳汁から各増殖因子を含む画分を得、それぞれの細胞及び皮膚に対する美肌効果を発揮する美肌剤に関する。

【構成】 インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子及び線維芽細胞増殖因子を含む反芻動物初乳又は単胃動物乳のホエー画分を有効成分とし、若しくは線維芽細胞増殖因子、ヘパラン硫酸プロテオグリカンを含む反芻又は単胃動物乳のクリーム画分、乳脂肪球皮膜及びバターミルク画分を有効成分とする美肌剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子及び線維芽細胞増殖因子を含む反芻動物初乳のホエー画分を有効成分とすることを特徴とする美肌剤。

【請求項2】 インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子及び線維芽細胞増殖因子を含む単胃動物乳のホエー画分を有効成分とすることを特徴とする美肌剤。

【請求項3】 線維芽細胞増殖因子、ヘパラン硫酸プロテオグリカンを含む反芻又は単胃動物乳のクリーム画分、乳脂肪球皮膜及びバターミルク画分を有効成分とする 10

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、ヒト及びウシなどの単胃及び反芻動物の乳汁から各増殖因子を含む画分を得、それぞれの細胞及び皮膚に対する美肌効果を発揮する美肌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】哺乳動物の乳汁には種々の増殖因子が含まれており、それぞれ種の新生児の健全な発育に必須である。たとえば、もつともよく研究されているヒトやウシでは、ヒトとウシ乳に共通して認められる増殖因子は、IGF（インスリン様増殖因子、Francis, G. L. et al. Biochem. J., 251, 95-103(1988)、Rinderknecht, E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2365-2369(1976)), TGF（形質転換増殖因子、Noda, K. et al., Gann, 75, 109-112 (1984), David, Y. J. et al., J. Protein Chemistry, 10, 565-575(1991)), 及び aFGF と bFGF（酸性と塩基性線維芽増殖因子、発明者ら未発表）であり、EGF（上皮細胞増殖因子）はヒト乳にのみ認められ、ウシ乳には存在しない（Shing, Y. W. et al., Endocrinology, 115, 273-282(1984))と報告されている。

【0003】これら各増殖因子の細胞特異性は極めて低く、広範囲の細胞に作用する。その作用範囲は増殖ばかりではなく、たとえばTGF- $\beta$ はマクロファージを不活性化することによる免疫抑制（Tsunawa K, S. et al., Nature, 334, 260-262, (1988))や結合組織、細胞外基質の主要成分であるコラーゲンファイブロンネクチンやプロテオグリカンの合成を促進させる（Kovacs, E. J. et al., Immunol. Today 12, 17(1991), Kelley, J., Am. Rev. Respir. Dis. 141, 765(1990))ことが確認されている。これら各増殖因子は個々に作用しているのではなく、相互に作用するネットワークを形成している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】したがって、美肌効果を期待するには、個々の増殖因子を単独で使用するよりも、より自然に近い形で混合物として使用する方が、その効果をより期待できるものと当然予想される。

【0005】またヒトとウシの各増殖因子を比較すると、これらの一次構造上の相同性は非常に高く、ほとん

ど同一であり、異種間の細胞にも同様に作用する。これらの見地から発明者らはヒト及びウシ乳汁から各増殖因子を含む画分を得、それぞれの細胞及び皮膚に対する影響を調べ、美肌効果が非常に高いことを見出し、この発明を完成した。

【0006】

【課題を解決するための手段】すなわち、この発明において、請求項1に記載の美肌剤は、インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子及び線維芽細胞増殖因子を含む反芻動物初乳のホエー画分を有効成分とする。また請求項2に記載の美肌剤は、インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子及び線維芽細胞因子を含む単胃動物乳のホエー画分を有効成分とする。更に請求項3に記載の美肌剤は、線維芽細胞増殖因子、ヘパラン硫酸プロテオグリカンを含む反芻又は単胃動物乳のクリーム画分、乳脂肪球皮膜及びバターミルク画分を有効成分とする。

【0007】

【作用】インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子及び線維芽細胞増殖因子を含む反芻動物初乳又は単胃動物乳のホエー画分を有効成分とし、若しくは線維芽細胞増殖因子、ヘパラン硫酸プロテオグリカンを含む反芻又は単胃動物乳のクリーム画分、乳脂肪球皮膜及びバターミルク画分を有効成分として美肌剤を製造する。

【0008】

【実施例】次に実施例でこの発明を詳細に説明する。

例1. ヒト乳からの調製法：分娩後2週間までの乳を遠心分離により、クリームと脱脂乳に分けた。クリームからチャーニング法により脱脂塊を除去し、バターミルク画分を得、pH4.6又はエタノール沈殿法により脱カゼインした。分画分子量3,000の限外濾過モジュール、又は透析膜で脱塩した後、凍結乾燥した。これをHuman butter milk derived FGF(HBM-FGF)とし、実験に供した。脱脂乳は最終カルシウム濃度とエタノールを0.05~0.1Mと10~20%になるようにCaCl<sub>2</sub>とエタノールを加え、pHを6.0に調整した後、40℃に加温した。生じた沈殿物を遠心分離で除去し、上清液をレチノイン酸固定化アミノセルロフアイン樹脂(RA-セルロフアイン、生化学工業社製)に接触させ、 $\beta$ -ラクトグロブリンを除去した。RA-セルロフアイン樹脂非吸着物を分画分子量3,000の限外濾過モジュール（旭化成社製）を用いて脱塩した後、凍結乾燥した。これをHuman skim milk derived growth factors(BCSM-GFs)とし、実験に供した。

【0009】例2. ウシ乳からの調整法：分娩後24時間以内の乳を実施例1に記載の方法で調整し、クリーム画分由来をbovine colostrum butter milk derived FGF(BCBM-FGF)とし、脱脂乳由来のものをbovine colostrum skim milk derived growth factors(BCSM-GFs)とし、実験に供した。

【0010】例3. 各調整物の増殖因子活性：HBM-FGFとBCBM-FGFは、ウシ臍帯内皮細胞に対する活性を、HSM-

GFsとBCSM-GFsはマウスBALB/C 3T3細胞を用い、それらの細胞数をカウントすることで活性を測定した。

【0011】a) HBM-FGFとBCBM-FGF:細胞増殖活性はウシ臍帯から酵素法(三井洋司ら編、機能細胞の分離と培養(1987)、227-229)で内皮細胞を得、10%FCS加RPMI 1640培地(ギブコ社製)で37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で3代予備培養した。96穴マイクロプレート(ファルコン社製)に50個/穴の細胞数になるように植え付け、無血清培地(RPMI 1640)に置換した後、HBM-FGFとBCBM-FGFを0-3%濃度になるように加え、48時間~72時間培養し、各穴の細胞数をカウントした。結果を図1に示した。

【0012】b) HSM-GFsとBCSM-GFs:細胞増殖活性はME M培地(ギブコ社製)にて、上記条件下で予備培養した3T3細胞を96穴マイクロプレートに(a)に記した条件で植え付け、HSM-GFsとBLSM-GFsを0-3%濃度になるように加

\*え、同一条件下で培養し、各穴の細胞数をカウントした。図2に結果を示した。

【0013】細胞外基質合成能はコラーゲン、ヒアルロン酸(HA)及びヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)の含量を測定した。つまり3T3細胞直径80mmのデツシユ(ファルコン社製)に植え付け、無血清RPMI 1640培地にHSM-GFsとBLSM-GFsをそれぞれ0-3%濃度になるように加え、(a)に記載の条件下で細胞数がコンフルエントになるまで培養した細胞をEDTAを用いて剥離し、デツシユに付着している細胞外基質を得た。コラーゲンは電気泳動法で、HAとHSPGはニトロセルロース膜二次元電気泳動法で測定した。結果を表1に示す。

【0014】

【表1】

	HSM-GFs 添加(%)				BCSM-GFs 添加(%)			
	0	1	2	3	0	1	2	3
コラーゲン	-	±	++	+++	-	+	++	+++
HA	-	±	+	++	-	+	+	++
HSPG	-	-	+	+	-	+	+	+

- : 陰性    ± : 疑陽性    +, ++, +++ : 陽性(活性の強さをあらわす)

【0015】例4. 肌荒れ改善効果: 23°C、50%湿度で飼育している生後4日目のマウスと16週令のマウスの背部5mm<sup>2</sup>にキシレンを塗布し、肌を荒れさせた。16時間後にBCSM-GFs 1%加市販美容液500mlを染み込ませたガーゼを塗布し、48時間同一条件下で飼育した。対照として、同一固体の背部5mm<sup>2</sup>にキシレンを塗布し、同一条件下で市販美容液を同量塗布し、同一条件下で48時間飼育した。判定は皮膚の状態を肉眼的に観察して行なつた。結果を表2に示す。

【0016】

【表2】

肌荒れ改善効果	
対照(美容液のみ)	-
BLSM-GFs 1%添加美容液	+

- : 効果なし    + : 効果あり

【0017】例5. アレルギー改善効果と抗アレルギー作用: 金属接触性皮膚アレルギー疾患のボランティアの左腕に金属を接触させ、炎症を誘発させた。その後例4に用いたものと同じBCSM-GFs添加及び無添加美容液を塗布し、その改善効果を肉眼的に観察した。また炎症を誘発する直前に同じ美容液を塗布し、金属を接触させた場合の炎症反応を肉眼的に観察した。結果を表3に示す。

【0018】

【表3】

	治療効果	予防効果
対照（美容液のみ）	-	-
BCSM-GFs 1%添加美容液	+	+

- : 効果なし + : 効果あり

【0019】

【発明の効果】この発明による美肌剤によつて、肌荒れの改善効果と共に抗アレルギー作用が得られた。

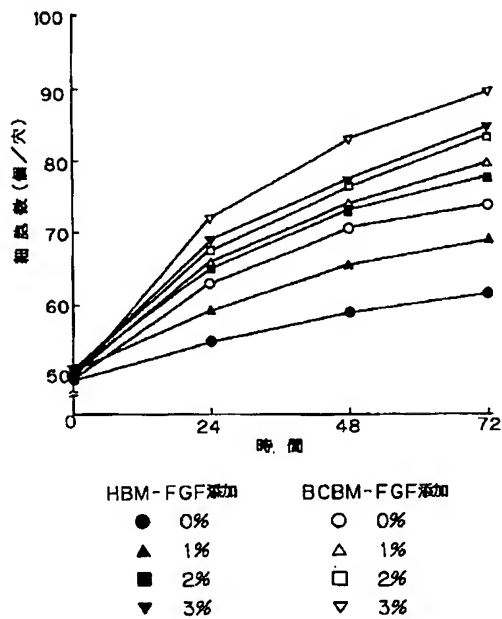
【図面の簡単な説明】

【図1】ウシ初乳にHBM-FGF又はBCBM-FGFを添加した各 \*

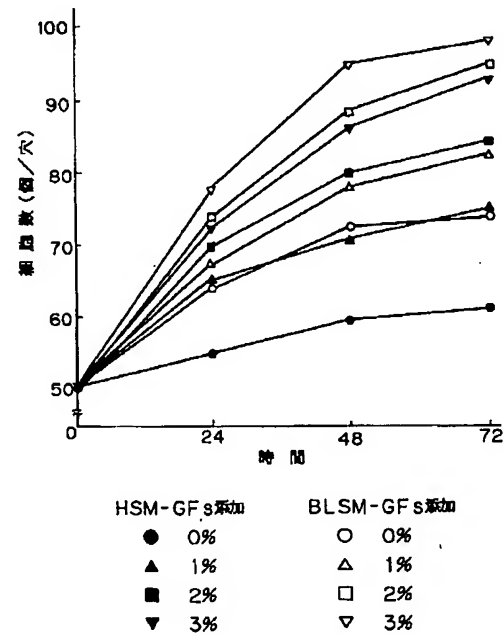
\* 調整物の細胞増殖活性を時間と細胞数の関係で示す図である。

【図2】ウシ初乳にHSM-GFs又はBLSM-GFsを添加した各調整物の細胞増殖活性を、時間と細胞数との関係で示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

A61K 38/27

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所